

Aus der Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

Direktor: Professor Dr. med. E. Keining

ÜBER DEN EFFEKT VON ENZYMINHIBITOREN AUF DIE
EPIDERMISDICKE GEPRÜFT IM AKANTHOSE-TEST

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde an der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

HEINZ WERLE

Mainz 1961

Dekan: Prof. Dr. med. H. Leicher
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. O. Braun-Falco
Korreferent: Prof. Dr. med. E. Keining
Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.1959

Datum des Diploms 25. Nov. 1959



GESAMTHERSTELLUNG

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

Die Dicke der Epidermis menschlicher und tierischer Haut ist der Ausdruck eines Gleichgewichtszustandes zwischen der Proliferationskapazität der basalen Zellagen des Stratum Malpighi einerseits und der Verhornungsgeschwindigkeit auf der anderen Seite. Daraus wird deutlich, daß einer Verbreitung des Stratum Malpighi, d. h. einer Akanthose grundsätzlich zwei Mechanismen zugrundeliegen können:

einmal eine vermehrte Proliferation epidermaler Zellen (Proliferationsakanthode (BERRES (1))), oder aber eine verzögerte Verhornungsrate (Retentionsakanthose (BERRES (2))).

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte aufgeklärt werden, daß die akanthotische Verbreiterung der Epidermis meistens eine Proliferationsakanthose darstellt und somit zurückgeht auf eine erhöhte mitotische Aktivität in den basalen Epidermiszellagen.

Wir kennen eine ganze Reihe von Substanzen

(Sexualhormone, Kohlwasserstoffe etc.),

die besonders im Tierversuch bei lokaler Applikation eine akanthotische Verbreiterung der Epidermis auslösen (3). SCHAAF und GROSS (4) haben 1953 den sog. Akanthosetest geschaffen, um damit Externa zu prüfen und eine Aussage zu machen über die akanthogene Wirkung von äußerlich angewandten Substanzen. Später hat sich herausgestellt (VONKENNEL (5)), daß die akanthogene Verbreiterung, die mit dem Akanthosewert gemessen wird, bei tierischer und menschlicher Haut sich analog verhält. Man hat somit im Akanthosetest eine weitere Möglichkeit, Substanzen hinsichtlich ihrer Hautindifferenz zu prüfen.

Obwohl der Akanthosetest zur Prüfung der Externa außerordentliche Verbreitung (6) gefunden hat, ist bisher praktisch nichts bekannt darüber, wie die akanthogene Verbreiterung der Epidermis zustandekommt (7). Man weiß nur, daß die akanthogene Wirkung nicht identisch ist mit einer toxischen Hautschädigung. Es muß sich demnach um Reize handeln, die offenbar wohl noch im physiologischen Bereich liegen (8). Die Annahme ist naheliegend, daß die Akanthose zustandekommt durch einen erhöhten Stoffwechsel in der Epidermis. Dafür sprechen auch histologische Befunde (STEIGLEDER (9)).

Die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, war Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Durch Enzyminhibitoren verschiedener Art, die in geringster Konzentration in Salbenform untergebracht, in Meerschweinchenhaut eingerieben wurden, versuchten wir, in den epidermalen Stoffwechsel einzugreifen und

prüften die Auswirkung dieses Vorgehens auf das Verhalten der Epidermisdicke im Akanthose-Test.

Wie Vorversuche zeigten, führt die lokale Applikation der Salbengrundlage bereits zu einer deutlichen Epidermisverbreiterung. Diese Epidermisverbreiterung läßt sich mittels der verschiedenen Fermentvlocker mehr oder minder stark aufheben. Allerdings ist die Proliferationshemmung niemals so stark ausgeprägt, daß Werte erreicht werden, die der normalen Haut entsprechen. Daraus ergab sich für uns die zwingende Notwendigkeit, den Akanthosefaktor aus dem Quotienten der nur mit Salbengrundlage und derjenigen mit Salbengrundlage plus Fermentblocker behandelten Haut zu bilden.

Methodisches Vorgehen: Für jede Testung wurden drei männliche Meerschweinchen von etwa 300 g Gewicht verwendet. Zunächst wurden die Tiere im Bereich beider Flanken mechanisch epiliert. Da sich herausstellte, daß die durch Rasieren gesetzten Epithelverletzungen reaktiv von einer gesteigerten Epidermisproliferation (Akanthose) begleitet werden, nahmen wir von diesem Vorgehen Abstand und entfernten die Haare derart, daß nur noch etwa 1 mm lange Haarstummel die Epidermisoberfläche überragten und so die nachfolgende Salbenapplikation nicht störten. Jede einzelne Tiergruppe wurde auf die Dauer des Versuches in Einzelkäfigen gehalten und erhielt normale Fütterung. Die jeweiligen geprüften Externa wurden auf der einen Flanke täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen unter leichtem Druck bei hundertfach kreisender Bewegung über einen Zeitraum von etwa 1 min. mit dem durch einen Gummifingerling geschützten Zeigefinger eingerieben. Um ein gleichmäßiges Maß der jeweils eingeriebenen Salbenmenge zu gewährleisten, wurde zu jeder Testung ein flachgestrichener Teelöffel voll Salbe angewandt.

Um eine Vorstellung darüber zu gewinnen, inwieweit der mechanische Vorgang des Reibens der Haut an sich bereits eine Epidermisverbreiterung hervorrufen kann, wurden die symmetrischen Kontrollstellen an den kontralateralen Flanken der Tiere teilweise völlig unbehandelt gelassen, teilweise aber auch mechanischen Einreibeprozessen ohne Salben unterzogen.

Am 11. Tage wurde den Tieren in Äthernarkose im Bereich beider Flanken je 1 Hautstück von je 2 x 1 cm Fläche entnommen. Die Fixierung erfolgte sofort mit neutralem Formalin, anschließend in üblicher Weise Einbettung in Paraffin. Die entparaffinierten Serienschritte wurden endlich mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Bei der Herstellung der Schnitte wurde auf das Sorgfältigste darauf geachtet, daß die Haut senkrecht zur Epidermisoberfläche geschnitten

wurde, um dadurch Fehler bezüglich der Epidermisbreite zu vermeiden.

Die Messung der Epidermisbreite wurde bei 500-facher Vergrößerung vorgenommen und in jeweils 40 Einzelmessungen der senkrechte Abstand von der unteren Grenze der Basalzellschicht bis zur unteren Grenze der Hornschicht bestimmt. In Fallikelnähe wurde auf Messungen bewußt verzichtet, da diese Werte teilweise recht erheblich von denen in den übrigen Epidermisanteilen abweichen können. Die Messungen selbst erfolgten mittels des Zeiss-Ocularmikrometers, wobei die relativen Mikrometer-Einheiten nach der in der Arbeitsvorschrift angegebenen Formel in μ umgerechnet wurden. Zur Berechnung des Einflusses der geprüften Externa auf die Epidermisbreite wurde einmal der Akanthosefaktor berechnet. Der Quotient aus der in μ angegebenen mittleren Epidermisbreite, der mit dem jeweiligen Fermentblocker behandelten Seite und der nur mit der Salbengrundlage desselben Tieres ergibt den Akanthosefaktor. SCHAAF und GROSS (10) geben zur Beurteilung des Akanthosefaktors folgendes Zahlenmaterial:

- 1,0 - 1,5 = keine oder fast keine Epidermisverbreiterung.
- 1,6 - 2,5 = deutliche, wenn auch noch mäßige Epidermisverbreiterung.
- 2,6 - 3,2 = mittlere bis starke Epidermisverbreiterung.
- 3,2 = starke Epidermisverbreiterung.

Der Akanthosefaktor ist gleich 1, wenn die Epidermisbreite der behandelten Seite mit der der Kontrollseite übereinstimmt. Tritt nach externer Vorbehandlung eine Verbreiterung der Epidermis auf, so wird der Akanthosefaktor größer als 1, vermindert sich dagegen unter einer Behandlung die Epidermisbreite gegenüber der Kontrolle, so wird er kleiner als 1.

Als Salbengrundlage wählten wir eine solche, die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ohne erheblichen Einfluß auf die normale Epidermisbreite ist, d.h. selbst nicht akanthogen wirkt.

Diese setzt sich wie folgt zusammen:

Carbowachs (4000) 45,0, Aqua dest. ad 50,0.

Um eine entzündungserregende Wirkung der zu prüfenden Substanzen zu vermeiden, wurden alle Enzyminhibitoren in einer 0,01 mol. Lösung in den wässrigen Anteil der Salbengrundlage eingearbeitet und zwar so, daß der 10 %ige wässrige Anteil durch die jeweils zu prüfende 0,01 mol. Enzyminhibitoren-Lösung ersetzt wurde. Bezogen auf das Gesamtgewicht der Salbe ergibt sich demnach, daß die einzelnen Enzyminhibitoren in einer 0,001 mola-ren Konzentration geprüft wurden.

Es handelt sich um folgende Enzyminhibitoren:

1.) - Ferricyanid	(mol./Gew. 0,16465)
2.) - Monojodessigacetat	(mol./Gew. 185,96)
3.) - Thioharnstoff	(mol./Gew. 0,038069)
4.) - Dinitrophenol	(mol./Gew. 184,11)
5.) - Kaliumcyanid	(mol./Gew. 65,12)
6.) - Hydroxylamin	(mol./Gew. 33,032)
7.) - Ninhydrin	(mol./Gew. 178,14)
8.) - Natriumacid	(mol./Gew. 0,03251)
9.) - Natriumfluorid	(mol./Gew. 0,0219)
10.) - Malonsäure	(mol./Gew. 0,05203)
11.) - Saccharinsäure	(mol./Gew. 0,111097)

Im allgemeinen ergab sich, daß es durch äußere Applikation von Enzyminhibitoren in Salben incorporiert offenbar gelingt, tiefgreifende Stoffwechselstörungen auszulösen, die sich in der Veränderung der Mitoserate der Epidermiszellen äußern und damit schließlich auch in einer Veränderung der Epidermisdicke.

Im Folgenden seien die Beobachtungen im Einzelnen beschrieben.

Untersuchungsergebnisse: Es zeigte sich, daß die verschiedenen Enzyminhibitoren eine unterschiedliche, aber doch erstaunlich deutliche Wirkung auf die Epidermisdicke entfalten.

Die Ergebnisse sind im folgenden dargestellt.

n = nur massierte Haut,

g = mit Salbengrundlage behandelte Haut,

c = mit Salbengrundlage und incorporiertem Fermentblocker behandelten Haut.

Sämtliche Zahlenangaben stellen die Epidermisdicke in μ dar.

Ferricyanid und Monojodacetat: Beide Substanzen interferieren mit allen Enzymen, für deren Aktivität die Anwesenheit freier Sulfhydrylgruppen erforderlich ist. Wie aus Tabelle 23 in dem Buch von HOFFMANN-OSTENHOFF deutlich wird, werden die genannten Substanzen an den verschiedensten Stellen des Stoffwechsels inhibierend wirksam und führen praktisch zu einer völligen Blockierung einer großen Anzahl physiologischer Stoffwechselprozesse. Während die Ferricyanidwirkung eine mildoxydative ist, gründet sich die Wirkung von Monojodessigsäure auf seinen alkylierenden Effekt (HOFFMANN-OSTENHOF (11)). Darüberhinaus aber können auch noch Aminogruppen mit der letztgenannten Substanz reagieren. Die Wirkung der beiden Substanzen auf die verschiedensten SH-Gruppen enthaltenden Fermente

manifestiert sich auch in dem Ausfall unserer Testergebnisse. Offenbar wird durch diese Substanzen der ganze Zellstoffwechsel auf das schwerste geschädigt. BULLOUGH (12) zeigte, daß derartige Substanzen die epidermalen Mitoseraten völlig blockieren. So nimmt es nicht wunder, daß auch in unseren Versuchsreihen drastische Effekte beobachtet werden konnten.

Sowohl unter Monojodessigsäure wie unter Ferricyanid kommt es zu einer deutlichen Verschmälerung der Epidermis. Der Akanthosefaktor für Monojodacetat-haltige Salbe konnte mit 0,75, derjenige der Ferricyanidhaltigen Salbe mit 0,63 errechnet werden.

Ferricyanid

12 n	477 g	477 c
66 58	30 33	30 22
62 50	34 30	31 21
68 52	28 41	32 24
71 54	35 46	28 27
70 40	31 34	26 32
74 41	29 37	21 31
78 38	36 35	18 30
70 37	39 39	19 15
61 39	37 40	22 16
60 40	42 43	26 19
55 42	44 41	21 22
52 45	46 42	23 19
54 38	41 32	29 21
57 37	46 31	30 23
50 38	45 29	32 18
56 42	40 28	31 16
47 40	44 29	16 17
42 33	43 31	15 20
40 38	39 34	17 23
48 42	38 33	20 25
1985 : 40 = 49,6	1475 : 40 = 36,6	928 : 40 = 23,2

Akanthosfaktor : 0,63

Monojodessigsäure

40 n	508 g	508 c
45 29	60 78	30 36
42 34	66 80	34 37
47 36	72 77	36 30
49 29	68 78	31 28
40 26	76 60	27 26
38 25	79 60	24 28
41 29	80 58	25 30
46 36	70 61	21 25
30 38	64 66	30 29
28 37	60 69	22 33
27 41	58 79	26 36
32 40	66 80	32 28
36 24	72 76	30 38
31 27	78 78	32 36
24 28	83 70	33 39
22 30	79 68	31 33
28 29	69 64	34 36
31 33	67 60	35 34
33 29	66 60	30 29
33 30	60 62	29 27
1333 : 40 = 33,3	2775 : 40 = 66,0	1229 : 40 = 30,7

Akanthosfaktor : 0,57

Thioharnstoff: Thioharnstoff hemmt die Phenoloxidasen. Sein Effekt auf die Epidermisdicke war nur gering, wie aus der Tabelle hervorgeht.

Thioharnstoff

16 n	17 n	494 g	494 c
32 50	33 40	58 90	60 51
36 48	35 42	62 92	63 51
37 40	36 44	66 88	66 59
41 38	34 41	72 87	68 57
40 31	38 44	71 80	62 50
42 34	41 45	69 79	61 48
39 36	40 43	74 84	68 44
36 32	44 40	76 83	69 50
46 38	37 46	66 89	70 59
49 40	38 49	68 93	68 56
49 44	41 48	74 94	63 55
51 45	40 40	70 84	61 59
56 41	32 42	72 73	60 47
53 43	31 45	63 76	58 48
49 46	34 39	60 75	56 49
55 42	30 38	69 79	59 43
45 40	28 47	77 87	51 41
48 38	34 48	81 93	53 40
40 46	35 49	79 96	55 47
51 47	38 51	78 95	57 49
1714 : 40 = 42,8	1596 : 40 = 39,9	2730 : 40 = 68,2	2251 : 40 = 56,2

Acanthosfaktor : 0,83

Dinitrophenol: 2,4 Dinitrophenol ist als Hemmkörper der oxydierenden Phosphatase bekannt (HOFFMANN-OSTENHOF (13)). Unter dem Einfluß dieses Fermentblockes wird insbesondere die Bindung von Phosphat gehemmt, während die Oxydation ungestört vonstatten geht. Über die Natur der unmittelbar an diesem Vorgang beteiligten energiereichen Phosphatbindung ist nichts Näheres bekannt. Dinitrophenol hemmt so die Verwertung der durch den Stoffwechsel entstehenden Energien. Es ist daher naheliegend, wenn diese Substanz die mitotische Aktivität der Epidermis auf das Stärkste unterdrückt und so bei 10-tägiger Anwendung zu einer extremen Verdünnung der Epidermis Veranlassung gibt. Die behandelte Epidermis erwies sich gegenüber der Kontrollseite um etwa das 5-fache verdünnt. Der Akanthosefaktor unter Dinitrophenol erreichte mit 0,18 den niedrigsten Wert unter allen geprüften Substanzen.

Dinitrophenol

36 n	509 g	509 c
29 29	90 98	14 14
31 28	68 110	15 11
28 36	92 120	24 18
34 38	88 112	15 16
29 40	80 121	16 18
36 42	94 118	26 16
38 31	97 113	24 20
30 30	96 111	13 14
33 27	89 102	16 11
36 29	87 96	15 10
30 33	88 91	14 12
30 36	93 90	16 13
38 39	98 124	19 24
37 30	102 122	12 22
34 36	99 104	11 21
32 34	108 103	14 26
38 33	96 97	10 18
39 30	90 91	16 20
30 28	91 90	17 16
31 29	102 104	13 21
1321 : 40 = 33,0	3670 : 40 = 91,0	660 : 40 = 16,5

Akanthosefaktor : 0,18

Kaliumcyanid: Dieser Enzyminhibitor hemmt bekanntlich vor allen Dingen das Cytochromsystem und damit die Zellatmung. Die Tabelle ergibt einen Überblick über die Intensität des Einflusses auf die Epidermisdicke und zeigt, daß auch durch Kaliumcyanid eine erhebliche Reduktion der Epidermisdicke erzeugt werden kann. Dies drückt sich auch in dem Akanthosfaktor aus, der ebenfalls mit 0,65 deutlich unter 1 liegt. Allerdings muß man hier berücksichtigen, daß auch durch die stark alkalische Reaktion eine Wirkung verursacht sein kann.

Kaliumcyanid

47 n	506 g	506 c
45 51	48 57	30 30
46 53	51 54	32 38
51 52	50 56	29 39
49 53	52 60	33 40
46 38	54 61	31 26
52 32	49 60	36 29
54 30	50 59	40 28
55 28	51 55	46 25
46 26	40 50	30 30
42 24	39 59	34 22
48 25	41 60	35 24
51 27	42 62	39 28
52 26	48 42	40 30
50 29	50 41	45 34
55 21	47 46	34 29
55 24	48 50	38 28
42 28	49 45	44 32
41 29	51 48	48 34
44 31	54 49	46 33
48 30	58 52	42 27

$$1637 : 40 = 40,9$$

$$2042 : 40 = 51,0$$

$$1139 : 40 = 33,4$$

$$\text{Akanthosfaktor} : 0,65$$

Hydroxylamin: Es war zu vermuten, daß auch durch Hydroxylamin ein Effekt auf die Epidermisdicke ausgeübt wird, da dieser Stoff zu den Substanzen gehört, die mit Coenzymen Verbindungen eingehen, indem sie mit den Aldehydgruppen von Coenzymen reagieren; so z. B. mit Pyridoxal-5-Phosphat, dem Coenzym der Aminosäuredecarboxylase. Sie blockieren daher an sehr wesentlicher Stelle den Stoffwechsel auf das Empfindlichste. Die Tab. zeigt, daß dieser Wirkstoff in die Salbengrundlage incorporiert, einen ganz drastischen Effekt auf die Epidermisdicke der damit behandelten Meerschweinchenhaut aufweist. 10-tägige Behandlung führt hier im Vergleich zur Kontrollseite zu einer Reduktion der Epidermisdicke um fast zwei Drittel und wird auch in dem Akanthosefaktor von 0,39 in charakteristischer Weise deutlich.

Hydroxylaminhydrochlorid

44 n	507 g	507 c
26 30	60 60	26 26
30 33	54 69	24 29
30 28	56 70	25 31
28 27	53 68	27 24
26 18	59 55	28 33
27 20	63 50	24 29
31 17	58 53	29 30
29 23	61 58	30 30
24 23	63 61	18 26
21 26	62 60	20 20
24 30	64 62	22 18
25 59	60 64	19 16
21 21	59 59	16 16
28 20	63 61	18 19
30 24	66 66	20 15
33 29	65 65	23 18
21 28	61 60	30 20
22 30	66 58	28 21
26 32	67 68	31 19
29 22	65 72	33 26
941 : 40 = 23,5	2463 : 40 = 61,5	959 : 40 = 23,9

Akanthosefaktor : 0,37

Ninhydrin: Ninhydrin führt zu einer Dehydrierung von Aminosäuren zu Iminosäuren mit anschließender Spaltung in Ammoniak, CO_2 und Aldehyd. Auf Grund seiner Affinität zu freien Aminosäuren hat Ninhydrin auch inhibitorische Eigenschaften auf Enzyme. Es ist erwähnenswert, daß es besonders hemmend auf die Nucleasen wirkt (HOFFMANN-OSTENHOF (14)). Die Aktivität dieser Enzyme findet sich in der Epidermis besonders in der keratogenen Zone, wo sie vor der Totalverhornung der Zellen beim Nucleinsäureabbau notwendig sind (SPIER und v. CANEGHEM (15)).

Die Beeinflussung der Epidermisdicke durch Ninhydrin war auffallend. Es kommt offenbar zu einer erheblichen Abbremsung der Proliferationskapazität der basalen Epidermiszellagen, sichtbar an der Hemmung der akantogenen Wirkung der Salbengrundlage.

Ninhydrin

33 n	501 g	501 c
45 35	82 78	40 39
36 36	76 76	32 37
38 30	71 84	42 41
39 34	68 87	51 42
30 30	72 62	43 49
31 29	76 64	41 53
34 27	80 69	44 51
34 36	75 70	39 48
32 37	84 78	46 47
31 30	79 80	38 40
29 28	72 80	36 46
28 32	78 88	40 48
28 29	80 81	47 51
31 36	81 77	49 50
26 34	79 72	48 47
29 30	70 73	50 48
26 26	86 64	42 42
23 29	88 69	46 40
29 32	85 71	40 45
31 30	80 76	38 48
1258 : 40 = 32,0	3051 : 40 = 71,2	1764 : 40 = 44,1

Akanthosfaktor : 0,62

Natriumacid: Dieser Wirkstoff ist als Inhibitor der Glykolysekette bekannt (HOFFMANN-OSTENHOF (13)) auch als Hemmstoff im Aufbau energiereicher Phosphatverbindungen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat Natriumacid einen erheblichen Effekt auf die Epidermisdicke. Während unter der einfachen Lokalbehandlung mit Salbengrundlage nach 10 Tagen die durchschnittliche Epidermisdicke bezogen auf die Messungen von 3 Kontrolltieren $76,5\mu$ beträgt, reduziert sich dieser Wert nach Behandlung mit der Natriumacid-haltigen Salbe ganz erheblich und beträgt nur noch $46,2\mu$. Der daraus zu errechnende Akanthosefaktor ist 0,6.

Normale, nur massierte Haut hat im Durchschnitt bei dieser Versuchsreihe eine Dicke von $41,4\mu$. Es geht demnach aus den Untersuchungen hervor, daß die Salbengrundlage an sich einen akanthogenen Effekt hat, daß dieser Effekt durch Zusatz von Natriumacid aber ganz erheblich gehemmt wird.

			Natriumacid			
22	n		476	g	476	c
32	30		62	78	42	56
38	44		68	86	48	50
36	47		71	78	46	58
41	56		78	73	51	60
43	40		84	88	40	42
29	40		76	90	43	38
34	39		70	94	38	39
40	32		82	84	49	44
47	44		76	85	50	46
50	48		70	85	52	56
52	50		72	74	45	47
46	52		68	69	49	43
33	36		66	90	56	40
37	39		60	89	40	37
39	41		59	88	41	38
42	37		67	82	46	41
46	38		82	77	43	45
45	40		84	78	46	49
41	47		81	71	48	52
38	43		99	84	49	50
1656 : 40 = 41,4			3061 : 40 = 76,5		1851 : 40 = 46,2	

Akanthosefaktor : 0,6

Natriumacid

21 n	499 g	499 c
34 34	84 65	40 53
29 33	81 79	46 52
35 42	79 77	48 56
36 43	76 74	50 59
38 28	78 90	40 44
30 27	80 94	42 39
37 30	86 88	39 37
36 34	88 90	48 48
26 35	91 87	53 41
29 39	90 85	51 50
28 40	87 81	47 48
25 41	83 78	48 44
28 36	76 60	50 39
34 37	79 63	44 36
36 32	70 67	41 39
35 29	86 68	43 40
40 26	60 65	46 46
41 30	63 69	45 50
38 36	66 70	49 51
39 38	67 74	47 47
1344 : 40 = 33,6	3086 : 40 = 77,1	1836 : 40 = 45,9

Akanthosefaktor : 0,59

Natriumfluorid: Natriumfluorid ist als sehr intensiver Enzyminhibitor bekannt. Es besitzt vor allem eine sehr starke Hemmwirkung auf die anaerobe Glykolyse (HOFFMANN-OSTENHOF (16)). Darüberhinaus wird durch Natriumfluorid aber noch eine ganze Reihe von anderen Enzymen gehemmt. Hingewiesen sei an dieser Stelle nur auf die Hemmwirkung der Phosphomonoesterasen, die eine bedeutende Rolle beim Keratinisierungsvorgang spielen (SPIER und MARTIN (17)). Weitere Enzyme, die durch Natriumfluorid inhibiert werden, sind die für den Zellstoffwechsel lebensnotwendige Katalase und Peroxydase. So ist es nicht verwunderlich, daß dieser Stoff einen erheblichen Effekt bei epicutaner Anwendung auf die proliferierenden Epidermiszellen ausübt und zu einer Veränderung der Epidermisdicke durch Hemmung des Zellstoffwechsels an den verschiedensten Stellen Veranlassung gibt. Aus der Tabelle wird deutlich, daß die deutliche akanthogene Wirkung - bezogen auf unbehandelte, nur massierte Haut - der Salbengrundlage durch Zusatz von Natriumfluorid völlig inhibiert wird. Nach 10-tägiger Behandlung mit diesem Inhibitor verhält sich die Epidermisdicke wie ohne Behandlung, infolge des hemmenden Einflusses auf die Zellproliferationskapazität.

Natriumfluorid

25 n	496 g	496 c
29 29	40 39	22 24
31 46	46 46	21 21
36 48	52 46	26 22
28 41	48 50	20 28
42 40	48 50	30 40
30 28	42 48	38 46
34 31	50 46	40 42
39 29	54 41	32 42
40 30	38 40	19 27
44 26	43 49	20 29
37 32	44 55	24 30
39 38	42 52	24 31
41 26	46 40	27 26
36 25	55 38	32 28
35 29	51 37	30 25
46 27	49 42	38 21
48 32	52 46	41 30
42 28	54 48	42 35
39 30	58 39	30 38
30 34	40 36	27 32

1391 : 40 = 34,8

1810 : 40 = 45,2

1200 : 40 = 30,0

Akanthosfaktor : 0,66

Natriumfluorid

24 n	26 n	480 g	480 c
27 38	31 31	57 68	26 38
30 30	28 32	62 74	29 33
26 29	26 28	61 75	27 34
31 28	29 30	66 72	25 38
34 36	30 40	63 79	22 41
36 39	33 39	60 77	28 44
35 35	34 41	59 70	30 42
37 34	35 42	56 62	31 38
26 30	37 46	70 61	33 39
25 27	40 45	76 60	33 42
29 29	38 41	74 74	35 47
31 33	36 39	78 77	36 36
30 30	32 42	76 55	38 29
30 34	30 39	79 59	31 30
36 37	30 34	69 56	32 31
39 38	34 32	66 50	36 27
41 41	28 33	62 52	36 26
40 40	27 37	64 51	32 24
33 44	29 36	63 57	37 25
36 45	30 39	60 58	39 24
1350 : 40 = 33,7	1389 : 40 = 34,7	2618 : 40 = 65,4	1314 : 40 = 33,3

Akanthosfaktor : 0,50

Malonsäure: Durch die Versuche von SENT-GYÖRGYI (18) wurde erstmalig die hemmende Wirkung der Malonsäure auf die Hauptatmung tierischer Gewebe festgestellt (18). Allerdings hat die Deutung, die er seinen Befunden im Rahmen seiner Theorie des Wasserstofftransportes durch die C₄-Dicarbonsäure gab, indessen nie recht befriedigen können, da er für die Beobachtung, daß Fumarsäure eine durch Malonsäure gesetzte Atmungshemmung aufheben kann, wobei unter anaeroben Verhältnissen Bernsteinsäure entsteht, keine Erklärung geben konnte. Das gelang erst KREBS 1940 (19), der darauf hinwies, daß nach der Theorie des Citronensäurecyklus Fumarsäure über Äpfelsäure-Oxalessigsäure ungestört in die Reaktionsfolge des Cyklus eintreten kann, und bei Vergiftung mit Malonsäure im Gefolge der dadurch gesetzten Hemmung der Succinatdehydrierung erst nachdem der ganze Cyklus durchlaufen ist, aerob Bernsteinsäure sich anhäufen muß.

Wir hatten von einer Behandlung mit Malonsäure in Salbengrundlage einen drastischen Effekt auf die Epidermisdicke erwartet. Wie die Tabelle zeigt, ist dies allerdings nicht der Fall. Die Hemmwirkung auf den akanthogenen Effekt der Salbengrundlage war nur sehr gering.

Malonsäure

30 n	495 g	495 c
33 31	55 77	56 55
27 30	59 81	54 56
27 28	60 72	55 58
30 26	54 73	52 57
30 39	58 69	50 55
30 40	59 74	49 56
34 43	60 78	48 57
38 42	61 79	58 50
41 36	66 80	60 59
42 37	63 84	61 65
40 38	65 81	59 59
37 39	66 70	58 69
39 40	71 59	64 70
36 44	70 63	66 71
38 43	71 61	62 74
30 46	68 62	67 58
24 47	60 69	66 51
27 48	68 76	60 50
28 40	69 79	59 48
30 40	70 80	58 47
1440 : 40 = 36,1	2738 : 40 = 68,4	2325 : 40 = 58,1

Akanthoséfakotr : 1,3

Saccharinsäure

19 n	18 n	500 g	500 c
29 30	31 28	58 71	61 70
31 33	34 36	62 70	59 69
28 30	32 28	67 76	63 75
36 30	39 34	69 79	64 73
38 39	37 36	71 80	66 72
39 40	41 34	66 81	60 70
31 42	36 40	60 84	62 67
32 43	34 44	68 86	67 70
40 37	37 36	70 78	59 69
36 36	39 29	77 97	61 60
37 33	41 31	81 76	57 54
39 31	41 29	88 70	58 58
43 29	45 26	86 74	56 58
40 27	44 27	83 79	58 56
38 29	41 29	81 75	60 59
37 26	38 28	84 71	62 66
40 28	37 33	73 67	66 70
39 31	41 34	76 70	69 69
36 31	34 36	74 71	68 65
35 32	31 38	79 68	68 74
1372 : 40 = 34,2	1237 : 40 = 30,9	2905 : 40 = 72,6	2573 : 40 = 64,3

Akanthosefaktor : 0,88

BESPRECHUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE :

Seit den Untersuchungen von SCHAAF und GROSS (20), die den Akanthosetest eingeführt haben, wurde die akanthotische Epidermisverbreiterung im Tierexperiment und ganz besonders beim Meerschweinchen herangezogen, um den Effekt von Substanzen mit spezifisch dermatotroper Wirkung zu prüfen und eine Aussage zu machen über die Hautdifferenz verschiedener lokal applizierter Stoffe. Wie SCHAAF (10) kürzlich zeigen konnte, ist der Akanthosetest von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängig, die berücksichtigt werden müssen, um exakte Aussagen machen zu können. SCHAAF konnte z.B. zeigen, daß der akanthoserezeugende Effekt verschiedener Substanzen von ihrer jeweiligen Konzentration bestimmt wird. Man hat den Akanthosetest für die Beurteilung von Wirkstoffen auf ihre klinische Bedeutung hin eingesetzt, nachdem VONKENNEL (6) zeigen konnte, daß sich der Akanthosetest für die gleiche Substanz bei tierischer und menschlicher Haut analog verhält. Zwar wissen wir heute noch nicht viel darüber, welche Bedeutung die hier nachgewiesene Akanthosewirkung für die menschliche Haut besitzt, generell ist man aber doch davon überzeugt, daß bei der Schaffung von Externa mit spezifischen dermatotropen Wirkstoffen solche nicht Anwendung finden sollten, deren akanthogener Effekt im Tierversuch einen physiologischen Bereich überschreitet.

Warum verschiedene Wirkstoffe wie z.B. Kohlenwasserstoffe, verschiedene Salbenkomponenten oder Oestrogene eine akanthogene Wirkung entfalten, ist bis heute ebenfalls ungeklärt. Man kann wohl mit Sicherheit unterstellen, daß die akanthogene Wirkung meistens nicht dadurch zustandekommt, daß die Verhornungsrate der Epidermiszellen bei gleichbleibender Mitoserate verzögert wird (gegensätzliche Befunde siehe BERRES (21)), sondern in erster Linie dadurch, daß die applizierten Stoffe die Mitoseaktivität in den basalen Epidermislagen anregen, d.h. daß wir es mit einer Proliferationsakanthose und nicht mit einer Retentionsakanthose zu tun haben. Da, wie diese Ausführungen zeigen, die akanthogene Wirkung von Stoffen sich in einer Proliferation von Epidermiszellen äußern, kann es sich nicht um schädigende Einflüsse auf die Epidermiszellen handeln, was auch von SCHAAF (22) betont wird. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Untersuchungen von BUJARD (23) verwiesen, die den Effekt aliphatischer Kohlenwasserstoffe unterschiedlicher Kettenlänge auf die Mitoseaktivität und den Reizeffekt am Zitzenepithel des Meerschweinchens geprüft haben. Diese Untersuchungen zeigen nämlich, daß diejenigen Kohlenwasserstoffe, die

einen toxischen Effekt haben und zur Nekrose führen, nicht diejenigen sind, die die meisten Mitosen auslösen. Auch aus dieser Reaktion wird deutlich, daß der akanthogene Effekt von Substanzen im Akanthoseversuch wohl noch im physiologischen Reaktionsbereich liegen und nicht die Antwort auf eine stärkere, echte toxische Schädigung von Epidermiszellen sein kann.

Um die Richtigkeit dieser hauptsächlich deduktiven Vorstellung zu prüfen, wurden die im vorhergehenden dargestellten Versuche besprochen. Hier wurden bewußt Substanzen im Akanthose-Test geprüft, die an den verschiedenen Stellen mit dem Zellstoffwechsel aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaften auf Zellenzyme interferieren. Wie die einzelnen Tabellen zeigen, gelingt es mit allen Enzyminhibitoren, die in einer Konzentration in Salbenform Anwendung fanden, die keinen direkt toxischen Effekt zeigt, eine Verdünnung der Epidermis gegenüber der Kontrollseite zu erreichen. Drastische Effekte zeigten dabei solche Enzyminhibitoren, die das Cystochromsystem hemmen, wie auch solche, die Sulfhydrylgruppen der verschiedenen Fermente blockieren. Durch Untersuchungen von BULLOUGH (12) wissen wir, daß durch Enzyminhibitoren wie Natriumfluorid, Kaliumcyanid, Malonsäure u. a. m., die Mitosenaktivität der Epithelzellen und des Haarfollikels *in vitro* außerordentlich stark gehemmt wird. Dieser Effekt kann auch durch unsere Versuche im Akanthose-Test bestätigt werden. Durch die inhibitorischen Eigenschaften der geprüften Substanzen wird auf dem Wege ihres Eingriffes in den Zellstoffwechsel die mitotische Aktivität mehr oder minder stark gehemmt. Der Nachschub an Epidermiszellen aus den Basalzellschichten vermindert sich zusehends, was sich in einer drastischen Veränderung der Epidermisdicke nach 10-tägiger Behandlung im Vergleich mit der Kontrollseite kenntlich macht und sich dadurch besonders ausdrückt, daß der Akanthosefaktor mehr oder minder weit unter 1 absinkt.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen demnach, daß es mit den verschiedenen Enzyminhibitoren gelingt, nicht nur keine Akanthose zu erzeugen, sondern die geringfügige akanthogene Eigenwirkung der Salbengrundlage gegenüber unbehandelter Haut ganz erheblich abzubremsen. Daraus wird deutlich, daß echte Störungen im Zellstoffwechsel zu einer Abbremsung der mitotischen Zellaktivität und damit zu einer Blockierung der physiologischen Rate der Epithelmauerung führen. Legt man sich angesichts dieser Ergebnisse wiederum die Frage vor, ob die akanthogene Wirkung von Substanzen toxischer Natur ist, so kann diese Frage wohl sicher verneint werden. Wir müssen annehmen, daß immer dann, wenn toxische Effekte an der Epidermis wirksam werden, diese zu einer Blockierung der mitotischen Aktivität und im Gefolge

damit zu einer Verschmälerung der Epidermis führen. Selbstverständlich besteht die Möglichkeit, daß es später reaktiv zu einer gesteigerten Mitoseaktivität und damit sekundär zu einem akanthogenen Effekt kommen kann. Eine reine akanthogene Wirkung, wie sie von vielen Substanzen bekannt ist, kann indessen nach unseren Untersuchungen nicht Ausdruck einer echten Zellstoffwechselschädigung sein, vielmehr muß man annehmen, daß diese Substanzen zu einer Aktivierung des Zellstoffwechsels und damit offenbar auch zu einer Aktivierung der Mitosenrate in der Epidermis führen. Die Frage, ob dieser Effekt direkt epidermaler Natur ist oder aber indirekt über eine Beeinflussung cutaner Elemente (Gefäßsystem) ausgelöst wird (geringe Entzündungsreaktion) ist heute noch nicht sicher zu sagen.

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene in Salbenform auf Tierhaut aufgebraachte Substanzen führen nach einer gewissen Behandlungszeit zur Akanthose.

Der Grad der akanthogenen Wirkung von extern applizierten Substanzen ist im Akanthose-Test faßbar (SCHAAF und GROSS (4)). Über die Frage, ob die Akanthose die Folge eines nah im physiologischen Bereich liegenden Reizes darstellt oder aber die Reaktion auf eine toxische Zellschädigung, wurden experimentelle Untersuchungen durchgeführt. Es wurden verschiedenste Enzyminhibitoren in eine reizlos vertragene Salbengrundlage in geringster Konzentration eingearbeitet und im Akanthose-Test auf ihre Wirkung ausgetestet. Die Resultate zeigen, daß besonders solche Enzyminhibitoren drastische Effekte zeigen, die das Cytochromsystem hemmen oder die Sulfhydrylgruppen verschiedener Enzyme blockieren. Es konnte festgestellt werden, daß über den Eingriff auf Stoffwechselvorgänge der Epidermiszellen deutliche Veränderungen der Epidermisdicke zu erzeugen sind, Durch fast alle geprüften Enzyminhibitoren konnte eine Abnahme der Epidermisdicke erreicht werden, die bei manchen Substanzen wie z. B. Dinitrophenol ganz extrem war.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß eine Störung des Epidermiszellstoffwechsels durch Enzyminhibitoren zu einer Veränderung der Mitoserate führt. Für den akanthogenen Effekt vieler Substanzen (Kohlenwasserstoffe, Oestrogene etc.) müssen demnach andere Mechanismen verantwortlich gemacht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BERRES, H.H.: Arch.f.Dermat.u.Syph. 194, 259 (1952)
2. BERRES, H.H.: Arch.f.Dermat.u.Syph. 203, 541 (1956)
3. SCHAAF, F. u. F. GROSS: Dermatologica (Basel) 106, 358 (1953)
4. SCHAAF, F. u. F. GROSS: Dermatologica (Basel) 106, 171 (1953)
5. VONKENNEL, J.: in F. Leiss u. H.H. Peter, Arzneimittel-Forschung, Aulendorf 4, 614 (1954)
6. VONKENNEL, J.: Parfümerie u. Kosmetik 36, B 33/249 (1956)
7. BUJARD, E., R. BRUN u. W. JADASSOHN: Dermatologica 114, 171 (1957)
8. SCHAAF, F.: Dermat. Wschr. 139, 12 (1959) 297
9. STEIGLEDER, G.K.: Arch.f.Dermat. 200, 377 (1955)
10. SCHAAF, F.: Dermat. Wschr. 139, 12 (1959) 303
11. HOFFMANN-OSTENHOF, O: Enzymologie, Springer-Verlag Wien 1954, S. 146
12. BULLOUGH, W.S. u. E.B. LAURENCE: The mitotic activity of the Follicle, in: Biology of Hair Growth, herausg. v. Montagna, W. u. R.A. Ellis, Academic Press Inc. New York 1958, Chapter 8, S.171
13. HOFFMANN-OSTENHOF, O: Enzymologie, Springer-Verlag Wien 1954, S.165
14. HOFFMANN-OSTENHOF, O: Enzymologie, Springer-Verlag Wien 1954, S.209
15. SPIER, H.W. u. P. v. CANEGHEM: Arch. f. Dermat. 206, 344 (1957)
16. HOFFMANN-OSTENHOF, O: Enzymologie, Springer-Verlag Wien 1954, S.687
17. SPIER, H.W. u. K. MARTIN: Arch.klin.exper.Dermat. 202, 120 (1956)
18. GÖZSY, B. u. A. SZENT-GYÖRGYI: Hoppe-Seyler's Ztschr. f.physiol.Chem. 224, 1 (1934)
19. KREBS, H.A.: Biochem. J. 34, 460 (1940)
20. SCHAAF, F. u. F. GROSS: Dermatologica (Basel) 106, 3/5 (1953) 170
21. BERRES, H.H.: Arch.klin.exper.Dermat. 203, 568 (1956)
22. SCHAAF, F.: Dermat. Wschr. 139, 12 (1959) 304
23. BRUN, R., E. BUJARD u. W. JADASSOHN: Dermatologica (Basel) 115, 35 (1957)

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Priv. -Doz. Dr. med.
O. Braun-Falco für die freundliche Überlassung des Themas, sowie
für die jederzeit mir zuteil gewordene Unterstützung danken.



LEBENS LAUF

Am 16. November 1924 wurde ich als Sohn des Weingutsbesitzers Gerhard Werle und seiner Ehefrau Maria, geb. Falkenstein in Forst/Rheinpfalz geboren. Bis 1943 besuchte ich das humanistische Gymnasium in Neustadt/Weinstraße. Anschließend Wehrdienst bis 1945. 1946/47 Vorsemester in Heidelberg. Im Sommersemester immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz, an der ich das gesamte Studium absolvierte. Da dieses zeitweilig unterbrochen wurde, konnte ich das Staatsexamen erst im Sommersemester 1954 in Mainz ablegen mit dem Prädikat "gut". Im Anschluß daran trat ich als Pflichtassistent in die Mainzer Universitäts-Hautklinik ein, erhielt dort meine Facharztausbildung und bin als Assistent tätig.



